

晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术与痰培养在临床中的应用

赵溜

作者单位: 410007 湖南长沙, 湖南省儿童医院儿科医学研究所

通信作者: 赵溜, Email: 729950752@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.03.011

【摘要】 **目的** 比较晶芯呼吸道病原菌核酸检测与痰培养对细菌的检出率, 探讨两种检测方法在临床中的应用价值。**方法** 收集 2019 年 3 月—4 月湖南省儿童医院 208 例下呼吸道感染患儿的痰液标本, 分别进行晶芯呼吸道病原菌核酸检测和普通痰培养, 比较两种检测方法的标本阳性率和不同类型病原菌检出率。**结果** 共纳入 208 份痰标本。晶芯呼吸道病原菌核酸检测的标本阳性率明显高于传统痰培养方法 [50.48% (105/208) 比 37.98% (79/208), $P < 0.05$]。两种检测方法对肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞菌、嗜肺军团菌和结核分枝杆菌复合群 4 种病原菌的检出结果达到一致; 但晶芯呼吸道病原菌核酸检测对肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌(金葡菌)、大肠埃希菌、肺炎支原体的检出率均明显高于传统痰培养方法(肺炎链球菌: 14.90% 比 2.40%, 金葡菌: 6.25% 比 3.85%, 大肠埃希菌: 9.13% 比 0%, 肺炎支原体: 5.29% 比 0%, 均 $P < 0.05$)。**结论** 相比于传统痰培养, 晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术可快速对细胞学进行现场评价, 等温扩增微流控技术可快速一次性全部检出下呼吸道病原菌。

【关键词】 幼儿; 下呼吸道感染; 等温扩增微流控技术; 痰培养

Clinical application of nucleic acid detection technology and for respiratory pathogenic bacteria in crystal core and sputum culture

Zhao Liu. Children's Research Institute, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: Zhao Liu, Email: 729950752@qq.com

【Abstract】 **Objective** To explore the detection rates of nucleic acid detection technology for respiratory pathogenic bacteria in crystal core and sputum culture, and compare the clinical application values of the two methods. **Methods** The sputum samples from 208 children with lower respiratory tract infection in Hunan Children's Hospital from March to April 2019 were collected. The nucleic acid detection technology of respiratory pathogenic bacteria in crystal core and general sputum culture test were carried out respectively, and the sample positive rates and the detection rates of different types of bacteria of the two methods were compared. **Results** Totally 208 sputum specimens from children with lower respiratory tract infection were included in the study. Compared with the result of traditional sputum culture test, the positive detection rate of nucleic acid detection technology for pathogenic bacteria in crystal core was significantly higher [50.48% (105/208) vs. 37.98% (79/208), $P < 0.05$]. The detection results of the two methods were consistent for 4 types of composite pathogenic bacteria group, including *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Legionella pneumophila* and *Mycobacterium tuberculosis*, but the results of detection rates using nucleic acid test for pathogenic bacteria in crystal core of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Mycoplasma pneumoniae* were significantly higher than those detected by traditional sputum culture tests (*Streptococcus pneumoniae*: 14.90% vs. 2.40%, *Staphylococcus aureus*: 6.25% vs. 3.85%, *Escherichia coli*: 9.13% vs. 0%, *Mycoplasma pneumoniae*: 5.29% vs. 0%, all $P < 0.05$). **Conclusion** Compared with traditional sputum culture, the nucleic acid detection technology of respiratory pathogenic bacteria in crystal core can rapidly evaluate the cytology in situ, and the isothermal amplification micro-fluidic control technology can quickly detect all lower respiratory tract pathogens at one time.

【Key words】 Young children; Infection of lower respiratory tract; Isothermal amplification micro-fluidic control technology; Sputum culture

随着抗菌药物应用的普及,随之出现的抗菌药物滥用成为呼吸道感染的众矢之的。呼吸道感染包括上呼吸道感染和下呼吸道感染,前者 90% 由病毒引起(包括鼻炎和咽喉炎),后者 90% 由细菌引起(包括支气管炎和肺炎等)。随着抗菌药物的广泛应用,耐药菌株队伍逐渐扩大,下呼吸道感染成为最常见且最难治疗的疾病,重者可伴随患者终生。据统计,下呼吸道感染在世界十大死因中居第 3 位,第 4 位慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)也是由下呼吸道长期感染引起^[1]。而痰液中病原菌种类的检测对治疗下呼吸道感染具有重要意义,传统痰培养对病原菌种类的检测耗费时间长,需 3~7 d,往往错过控制感染的最佳时期;相反,晶芯呼吸道病原菌核酸检测采用的是恒温扩增微流控原理^[2],可快速检测出 13 种常见下呼吸道病原菌。本研究通过对比两者的细菌检出率,旨在研究其在临床应用中的价值,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 方法

1.1.1 痰标本来源与采集 收集 2019 年 3—4 月在本院住院的 208 份下呼吸道感染患儿的痰液标本。留取方法:在患儿刚入院时,由各病区专业护士指导患儿家属留取患儿痰液。痰液需留取清晨漱口后用力吐出,若唾液较多则重新留取。留取成功后家属迅速将标本送至检验科,由检验科专门人员检查。若痰液标本合格,则立即置于 -20 °C 冰箱中保存待检^[3]。

1.1.2 检测方法 将患儿痰标本涂在巧克力平板或血平板上进行痰培养,平板均由英国 OXOID 公司提供。痰标本固定成功后置于 37 °C 恒温箱孵育,24 h 后选出优胜菌群进一步分析。晶芯等温扩增技术采用呼吸道病原菌核酸测试剂盒^[4],原理为具有链置换功能的聚合酶在 65 °C 恒温条件下进行反应,无需考虑变温引起的包括时间在内的其他任何耗损。因为过程中减少了高温变性和低温退火两个过程,因此细菌的扩增速度很快,可以在短时间内完成靶

向核酸的扩增,然后利用荧光染料掺入法进行实时荧光检测,达到扩增效果的靶核酸会以“S 型”曲线扩增^[5]。

1.2 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,组间计数资料以例或百分率表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患儿一般情况 患儿年龄为 1 个月~12 岁。所有患儿的年龄和既往史等一般资料比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 208 例下呼吸道感染患儿的一般资料比较

检测方法	样本数 (份)	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	既往史(例)			
			支气管炎	哮喘	肺炎	喉炎
痰培养	208	8.0 ± 2.5	87	67	43	11
晶芯呼吸道病原菌检测	208	8.0 ± 2.5	87	67	43	11

注:与痰培养比较,^a $P < 0.05$

2.2 两种检测方法的标本阳性检出率比较 共纳入 208 份下呼吸道感染标本。晶芯呼吸道病原菌检测对标本的阳性检出率明显高于痰培养($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两种检测方法对下呼吸道感染患儿痰液标本病原菌的检出情况比较

检测方法	样本数 (份)	阳性数 (份)	阴性数 (份)	阳性率 (%)
痰培养	208	79	129	37.98
晶芯呼吸道病原菌检测	208	105	103	50.48 ^a

注:与痰培养比较,^a $P < 0.05$

2.3 两种检测方法的病原菌检出率比较 晶芯呼吸道病原菌核酸检测对肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌(金葡菌)、大肠埃希菌、肺炎支原体的检出率均明显高于传统痰培养方法。见表 3。

3 讨论

根据世界卫生组织各项数据统计,呼吸道感染仍然是全球范围内威胁人类健康的疾病之一^[6],占所有疾病致死率的首位,而下呼吸道感染又是呼吸道感染中最常见的疾病^[7]。目前抗菌药物的普遍应

表 3 两种检测方法对各类病原菌的检出率比较

细菌类型	份数 (份)	检出率(%(株))												
		肺炎链球菌	金葡菌	大肠埃希菌	肺炎克雷伯菌	铜绿假单胞菌	鲍曼不动杆菌	嗜麦芽窄食单胞菌	流感嗜血杆菌	嗜肺军团菌	结核分枝杆菌复合群	肺炎支原体	肺炎衣原体	
痰培养	208	2.40(5)	3.85(8)	0(0)	1.44(3)	0(0)	3.85(8)	0(0)	22.60(47)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
晶芯呼吸道病原菌检测	208	14.90(31) ^a	6.25(13) ^a	9.13(19) ^a	1.44(3)	0.48(1)	1.44(3)	0(0)	22.12(46)	0(0)	0(0)	5.29(11) ^a	0.48(1)	

注:与痰培养比较,^a $P < 0.05$

用导致耐药菌种类增多,下呼吸道感染的病死率增加,特别是幼儿和老年人的免疫系统低下,严重的下呼吸道感染更增加了上述人群的病死率^[8]。无论是院外感染的社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)、COPD 急性加重期、慢性支气管炎急性加重期,还是入院 24 h 后感染的医院获得性肺炎,若不能及时明确细菌种类、确定临床治疗方向,仅采取应用广谱抗菌药物的经验性治疗,最后的结局只能是造成耐药菌群逐渐扩大,下呼吸道感染病死率越来越高^[9]。所以,确定病原体种类是临床治疗的关键,传统痰培养的检测过程繁琐,不仅培养病原菌的周期较长,而且获得的结果不一定准确,但这也是在临床应用中基础的确证方法。为此本院引进了新的痰标本病原体种类检测技术,即晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术。

本研究选取 208 例下呼吸道感染患儿的痰液标本,分别采用晶芯呼吸道病原菌核酸检测和痰培养的方法在同一时间同一环境内对细菌进行培养及检测。晶芯呼吸道病原菌核酸检测对标本的阳性检出率达 50.48%,痰培养则为 37.98%,显然前者的检出率大于后者,虽然两者差距不大,但是在差距较小的条件下,还应选择晶芯呼吸道病原菌核酸检测进行临床病原体诊断,即在相同检出率的前提下选择更简单、快捷的方式^[10]。晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术在 2 h 内即可判断病原体是否扩增,而传统痰培养则需将痰标本在保温箱中孵育 24 h 以上,待其自然扩增。由此更能体现晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术的敏感性和特异性均高于痰培养,并且降低了耽误患者病情的风险。

本研究显示,晶芯呼吸道扩增技术对病原体的检出率与痰培养一致,甚至前者的敏感性要高于痰培养。另外,两种检测方法对常见细菌如肺炎克雷伯杆菌的检出率是相同的,均为 1.44%,而对嗜麦芽窄食单胞菌、嗜肺军团菌和结核分枝杆菌复合群的检出率均为 0%,晶芯病原体核酸检测对常见病原菌(如肺炎链球菌、金葡菌、大肠埃希菌、肺炎支原体)的检出率均高于痰培养。除此之外,由于痰培养标本需在保温箱中培育较长时间,不能排除在此过程中有其他细菌感染和侵入,从而使某些细菌增多导致敏感性高的假象,痰培养技术中痰标本的保存及痰细菌病原体的扩增过程可能会受各种条件的限制,更能证明晶芯呼吸道扩增检测技术具有较高的敏感性和特异性。

本院对晶芯呼吸道扩增检测这一新技术进行学习和研究,并将其应用于临床。在临床应用和研究过程中仅对常见感染病原体的菌株进行扩增,研究证明,晶芯呼吸道扩增检测通过等温扩增技术,可灵敏、快捷并且准确地检测出下呼吸道感染患者痰液中常见的病原体种类,相对传统的痰培养来说要更为容易,简单而言,只要有病原菌,哪怕一个核酸序列,晶芯呼吸道扩增检测技术即可扩增出一群病原体^[10]。此特点明显优于一般的痰细菌培养,且检出率也高于常规痰培养技术。本研究通过与传统痰细菌培养技术进行对比,显示晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术在诊断不同病原体方面更具优势,为临床快速检出上下呼吸道病原体和积极治疗患者提供了重要的保障。晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术高敏感性和高特异性的特点对临床诊断具有重要的价值,尤其对幼儿下呼吸道感染的积极治疗具有重要意义,值得临床积极探讨和运用。

参考文献

- 1 林牧,周开元,韩晓静,等.环介导恒温扩增技术在下呼吸道病原菌检测的应用[J].现代医药卫生,2019,35(2):270-272. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2019.02.034.
- 2 吴晓晴,汪东,薛文静,等.晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术与痰培养在临床中的应用[J].检验医学与临床,2019,16(1):107-109. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.036.
- 3 钱婧,朱春梅,曹玲,等.呼吸道病原菌基因检测法诊断儿童肺炎链球菌感染的临床价值[J].中华全科医学,2018,16(9):1512-1514,1525. DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000413.
- 4 王咏红,郭雅洁,陈玉莹,等.恒温扩增芯片法在儿童下呼吸道感染性疾病中的应用价值评估[J].中国循证儿科杂志,2018,13(3):176-179. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2018.03.004.
- 5 李松,何晓光,马可泽.环介导恒温扩增芯片法在机械通气新生儿下呼吸道病原菌检测中应用[J].广东医科大学学报,2018,36(2):169-172. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4057.2018.02.015.
- 6 陈愉生,王大璇,李鸿茹,等.环介导等温扩增技术在下呼吸道感染常见病原体检测中的应用[J].中华结核和呼吸杂志,2014,37(4):270-273. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2014.04.010.
- 7 李建生.下呼吸道感染若干问题的思考[J].中华危重病急救医学,2011,23(1):3-4. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.01.002.
- 8 郭宽鹏,李先斌,宋春荣,等.儿童下呼吸道感染病原学特点及耐药性分析:一项来自省级儿童医院 2 年的痰标本结果[J].实用检验医师杂志,2017,9(1):8-12. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.01.003.
- 9 冯义宽.我国华中地区成人社区获得性肺炎病原学及人冠状病毒流行病学调查[D].武汉:华中科技大学,2016.
- 10 刘娜.应用环介导等温扩增技术对重症肺炎常见病原体诊断的回顾性研究[D].南昌:南昌大学,2014.

(收稿日期:2019-06-27)

(本文编辑:张耘菲)